

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291071

研究課題名(和文)多機能抗体を用いたエピジェネティクス操作によるヒストン修飾の意義の解明

研究課題名(英文) Understanding biological significance of histone modifications by epigenetic manipulation using multifunctional antibodies

研究代表者

木村 宏 (Kimura, Hiroshi)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

研究者番号：30241392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物の細胞核DNAはヒストンと強く結合し、クロマチンとして存在している。ヒストンの多様な翻訳後修飾を受けるが、修飾の生物学的意義については不明な点が多い。本研究では、抗体を用いた阻害実験、修飾を受けたクロマチンに特異的に結合する蛋白質の探索、修飾を生細胞で可視化するプローブの開発、を行った。リン酸化ヒストン特異的抗体を細胞内に導入すると染色体の不分離が見られたが、この要因は姉妹染色体間の結合であると考えられた。リン酸化されたクロマチンに結合する候補因子として見出された蛋白質は、セントロメアに局在した。また、新規の生細胞可視化プローブの作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：DNA in eukaryotic nuclei forms chromatin by binding with histone proteins. Histones are subjected to a variety of posttranslational modifications, but the biological significance of those modifications remains largely unknown. In this study, we performed inhibitory assay based on antibody injection, identification of proteins that bind to specifically modified chromatin, and development of new live cell modification probes. When phosphorylated histone-specific probes were injected into cells, chromosome missegregation was observed, which probably resulted from bridging between sister chromatids. A candidate protein that bound to phosphorylated chromatin localized to centromeres. Finally, we developed some new modification-specific intracellular antibody probes that could monitor specific modifications in living cells.

研究分野：細胞生物学・エピジェネティクス

キーワード：クロマチン エピジェネティクス 遺伝子発現制御 転写 ヒストン修飾 細胞分裂 抗体

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞核中の DNA は、クロマチンの基本単位であるヌクレオソーム構造 (約 150 塩基対の DNA が、H2A、H2B、H3、H4、各 2 分子ずつからなるヒストン 8 量体を取り巻いた構造) をとって存在している。転写調節やゲノム恒常性維持には、このヌクレオソームを構成するヒストンの翻訳後修飾が重要な役割を果たしていることが最近分かってきた。特に、クロマチン免疫沈降と大規模塩基配列解析 (ChIP-seq) を用いて様々な細胞種におけるゲノム上のヒストン修飾の分布が俯瞰できるようになり、遺伝子発現制御と特定の修飾との相関が見出されている。また、個々のヒストン修飾酵素、脱修飾酵素の機能解析も遺伝子のノックアウトや蛋白質複合体解析により、盛んに行われている。しかしながら、一つの修飾酵素・脱修飾酵素がヒストン上の単一のアミノ酸残基のみを標的にするとは限らず、また、複数の酵素が同一のアミノ酸残基を標的とする場合も多い。一方、出芽酵母においてヒストンの点変異体解析によりそれぞれのアミノ酸の重要性が調べられているが、例えば、リジン残基の場合、アセチル化、モノメチル化、ジメチル化、トリメチル化、非修飾の 5 つの状態をとるため、アラニン置換体の表現型の解釈は単純ではない。従って、特定のヒストン修飾が持つ生物学的機能については不明である。

研究代表者らは、個々のヒストン修飾に対するマウスモノクローナルパネルを作製し、エピゲノム解析や修飾動態解析に用いてきた。特に、抗体から抗原結合断片 (Fab) を調製し、蛍光標識した後に培養細胞やマウス受精卵に導入することで、生きた細胞内でヒストン修飾を可視化する技術 (FabLEM; Fab-based live endogenous modification labeling) を開発した。また、抗体をコードする cDNA から可変領域をクローニングし、一本鎖可変領域抗体 (scFv; single-chain variable fragment) と蛍光蛋白質を融合させた修飾特異的細胞内抗体 (Mintbody; modification-specific intracellular antibody) として発現させることで、培養細胞や生きている動物個体でヒストン修飾を検出することにも成功している。これらの Fab や Mintbody プローブを用いたヒストン修飾の可視化には、それらの細胞内分子数 (導入量や発現量) を厳密にコントロールする必要があると考えられた。即ち、細胞内で少量のプローブが存在する場合は、細胞の増殖や動物の発生に影響を与えないが、Fab を過剰量導入すると細胞増殖を阻害する可能性がある。従って、細胞内に存在するヒストン修飾プローブの量と性質を調節することで、ヒストン修飾の機能阻害を行うことが出来るのではないかと考えた。また、様々な修飾を持つクロマチンに特異的に結合する蛋白質を探索することによっても修飾の意義を明らかにすることができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、様々なヒストン修飾に特異的な抗体を生細胞核内に導入し、特定の修飾をブロックすることで、それぞれの遺伝子発現や細胞分裂への制御への影響を明らかにすることを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) 抗体の生細胞への導入と生細胞イメージング

ヒストン修飾特異的モノクローナル抗体をハイブリドーマ上清から精製し、高濃度 (数 mg/ml) に濃縮し、ビーズローディング法により細胞に導入した。生細胞での染色体動態を観察するために、蛍光標識 Fab も同時に導入した。

蛍光観察には、スピニング型共焦点顕微鏡 (横河電機・CSU-W1、ニコン・Ti-E、Andor・iXon3) を用いた。

(2) 特定の修飾を持つクロマチンに結合する因子の探索

非同調の HeLa 細胞、および、ノコダゾール処理により M 期に同調した細胞からクロマチンを調製し、様々な修飾特異的抗体またはコントロール IgG を付加したビーズを用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物をポリアクリルアミドゲルで分離後、質量分析により共沈した蛋白質を同定した。

候補蛋白質をコードする cDNA を用いて GFP 融合蛋白質としての発現ベクターを構築し、また、様々な欠失変異体を作製し、ヒト培養細胞内で発現させ、局在を解析した。

(3) Mintbody の開発

修飾特異的モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマから RNA を抽出し、RNA-seq により、IgG 重鎖と軽鎖の塩基配列を決定した。その配列をもとに PCR により可変領域をクローニングし、一本鎖可変抗体を作製した。蛍光蛋白質との融合蛋白質として培養細胞で発現させ、その局在を観察した。ヒストン H3 Lys9 のトリメチル化特異的 Mintbody (H3K27me3-mintbody) に関しては、ランダム変異や部位特異的変異により、細胞内でもり安定な変異体の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞分裂におけるヒストン H3 リン酸化の意義

ヒストン H3 の Ser10 と Ser28 のリン酸化 (H3S10ph、H3S28ph) に特異的なモノクローナル抗体をそれぞれ大量に調製し、ビーズローディング法により細胞の細胞質に導入した。抗体は分子量が大きすぎて核膜を通過できないため、M 期に核膜が崩壊した後に修飾ヒストンに結合する。そのため、最初の分裂期

におけるヒストン修飾の機能を阻害すると考えられた。また、分裂期の染色体動態を可視化するため、導入した抗体とは異なるリン酸化を認識する蛍光標識 Fab を同時に導入した。その結果、コントロールの非特異的抗体に比べて、H3S10 のリン酸化抗体と H3S28 のリン酸化抗体を導入した場合、生細胞観察によって分裂期の時間の遅延や染色体の不分離などに異常が見られた(図1)。また、免疫蛍光抗体染色によっても、染色体分配の異常が確認された。また、モノメチル化 H4K20 (H4K20me1) に特異的な抗体を細胞に導入したところ、細胞周期の長さや他の修飾に変化が見られた。

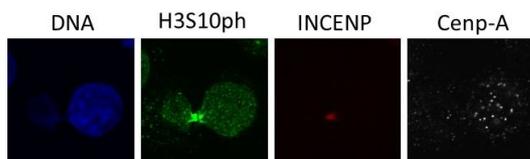


図1. H3S28 リン酸化抗体 (IgG) の導入による染色体の不分離

しかしながら、リン酸化特異的 Fab を導入し、染色体分配に対する影響を調べたところ、IgG による影響とは異なり、Fab の場合には分配異常は見られなかった。従って、一定量のリン酸化をマスクしただけでは分裂に影響しないと考えられた。IgG の導入により見られた影響は、姉妹染色体間をブリッジすることで染色体の不分離を誘導したと考えられた。このことから、抗体による阻害実験に関しては、単なるマスク効果だけではなく、抗原間の結合による影響も考慮する必要があることが示された。

(2) リン酸化クロマチンに結合する蛋白質。

リン酸化ヒストンと共に免疫沈降される蛋白質を質量分析で探索したところ、いくつかの候補が得られた。そのうちの一つは、アセチル化リジンと結合するプロモドメインを持つ蛋白質であり、この蛋白質のクロマチン結合の解析を行った。リン酸化される部位のセリンやスレオニンアラニンに置換したヒストン H3 との結合を解析したところ、どの部位の変異も結合には影響しなかった。

この蛋白質は、セントロメアにも局在するであり(図2) その局在化ドメインの絞り込みを行ったところ、プロモドメイン以外の場所がセントロメア局在に必要であることがわかった。また、この蛋白質を強制的にクロマチンにテザリングすると、多くのセントロメア蛋白質もその場所に局在することが明らかになった。したがって、この蛋白質は、セントロメアクロマチンの形成を促進することが示唆された。

セントロメアクロマチンには特定のヒストン修飾が存在することから、今後の研究によりセントロメアクロマチン形成とヒストン修飾との関係が明らかにできると期待できる。

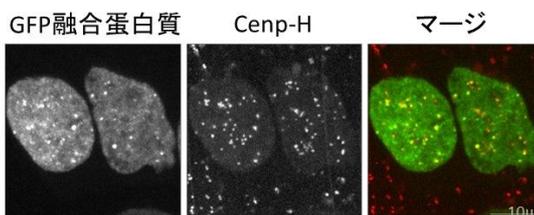


図2. プロモドメインを持つ蛋白質 (GFP 融合蛋白質) の局在

(3) 新規 Mintbody の作製

新規 Mintbody の開発のために、多数のハイブリドーマから scFv をクローニングし、scGFP 融合蛋白質として細胞中での発現を行った。その結果、ヒストン H4K20 ジメチルや転写伸長型 RNA ポリメラーゼ II に特徴的なリン酸化等を特異的に認識するプローブが得られた。さらに、オリジナルクローンにいくつかのアミノ酸変異を導入することで H3K27me3 特異的 mintbody の発現に成功した。この H3K27me3-mintbody をヒトやマウスの雌体細胞に発現させると、不活性 X 染色体に濃縮された。また、大腸菌で発現、精製した H3K27me3-mintbody の特異性をペプチドアレイや免疫染色、ウェスタンブロッティング等で解析し、H3K27me3 に特異的に反応することを確認した。今後、この mintbody を用いた可視化や遺伝子操作により転写抑制や活性化の機構を明らかにできると期待される。

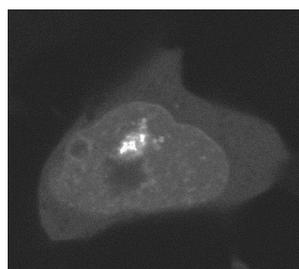


図3. マウス MC12 細胞に発現させた H3K27me3 特異的 mintbody の局在

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

1. Parry AJ, Hoare M, Bihary D, Hänsel-Hertsch R, Smith S, Tomimatsu K, Mannion E, Smith A, D'Santos P, Russell IA, Balasubramanian S, Kimura H, Samarajiwa SA, Narita M. NOTCH-mediated non-cell autonomous regulation of chromatin structure during senescence. Nat Commun. 2018, 9(1): 1840. doi: 10.1038/s41467-018-04283-9 査読有
2. Ruppert JG, Samejima K, Platani M, Molina O, Kimura H, Jeyaprakash AA, Ohta S, Earnshaw WC. HP1 targets the

- chromosomal passenger complex for activation at heterochromatin before mitotic entry. *EMBO J.* 2018, 37(6). pii: e97677. doi: 10.15252/embj.201797677 査読有
3. Jenness C, Giunta S, Müller MM, Kimura H, Muir TW, Funabiki H. HELLS and CDCA7 comprise a bipartite nucleosome remodeling complex defective in ICF syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018, 115(5): E876-E885. doi: 10.1073/pnas.1717509115 査読有
 4. Chen CCL, Goyal P, Karimi MM, Abildgaard MH, Kimura H, Lorincz MC. H3S10ph broadly marks early-replicating domains in interphase ESCs and shows reciprocal antagonism with H3K9me2. *Genome Res.* 2018, 28(1): 37-51. doi: 10.1101/gr.224717.117 査読有
 5. Imre L, Simándi Z, Horváth A, Fenyőfalvi G, Nánási P, Niaki EF, Hegedüs É, Bacsó Z, Weyemi U, Mauser R, Ausio J, Jeltsch A, Bonner W, Nagy L, Kimura H, Szabó G. Nucleosome stability measured in situ by automated quantitative imaging. *Sci Rep.* 2017, 7(1): 12734. doi: 10.1038/s41598-017-12608-9 査読有
 6. Sato Y, Kimura H. Semi-quantitative Analysis of H4K20me1 Levels in Living Cells Using Mintbody. *Bio-protocol.* 2017, 7(10): e2276. doi: 10.21769/BioProtoc.2276 査読有
 7. Partolina M, Thoms HC, MacLeod KG, Rodriguez-Blanco G, Clarke MN, Venkatasubramani AV, Beesoo R, Larionov V, Neergheen-Bhujun VS, Serrels B, Kimura H, Carragher NO, Kagansky A. Global histone modification fingerprinting in human cells using epigenetic reverse phase protein array. *Cell Death Discov.* 2017, 3: 16077. doi: 10.1038/cddiscovery.2016.77 査読有
 8. Sato Y, Kujirai T, Arai R, Asakawa H, Ohtsuki C, Horikoshi N, Yamagata K, Ueda J, Nagase T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kimura A, Kurumizaka H, Kimura H. A Genetically Encoded Probe for Live-Cell Imaging of H4K20 Monomethylation. *J Mol Biol.* 2016, 428(20): 3885-3902. doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.010 査読有
 9. Kaimori JY, Maehara K, Hayashi-Takanaka Y, Harada A, Fukuda M, Yamamoto S, Ichimaru N, Umehara T, Yokoyama S, Matsuda R, Ikura T, Nagao K, Obuse C, Nozaki N, Takahara S, Takao T, Ohkawa Y, Kimura H, Isaka Y. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. *Sci Rep.* 2016, 6: 24318. doi: 10.1038/srep24318 査読有
 10. Martins NM, Bergmann JH, Shono N, Kimura H, Larionov V, Masumoto H, Earnshaw WC. Epigenetic engineering shows that a human centromere resists silencing mediated by H3K27me3/K9me3. *Mol Biol Cell.* 2016, 27(1): 177-196. doi: 10.1091/mbc.E15-08-0605 査読有
 11. Kimura H, Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, Sato Y. Visualizing posttranslational and epigenetic modifications of endogenous proteins in vivo. *Histochem Cell Biol.* 2015, 144(2): 101-109. doi: 10.1007/s00418-015-1344-0 査読有
 12. Dias JD, Rito T, Torlai Triglia E, Kukalev A, Ferrai C, Chotalia M, Brookes E, Kimura H, Pombo A. Methylation of RNA polymerase II non-consensus Lysine residues marks early transcription in mammalian cells. *Elife.* 2015, 4. pii: e11215. doi: 10.7554/eLife.11215 査読有
 13. Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, Kurumizaka H, Nozaki N, Kimura H. Evaluation of chemical fluorescent dyes as a protein conjugation partner for live cell imaging. *PLoS One.* 2014, 9(9):e106271. doi: 10.1371/journal.pone.0106271 査読有
 14. Shono N, Ohzeki J, Otake K, Martins NM, Nagase T, Kimura H, Larionov V, Earnshaw WC, Masumoto H. CENP-C and CENP-I are key connecting factors for kinetochore and CENP-A assembly. *J Cell Sci.* 2015, 128(24): 4572-4587. doi: 10.1242/jcs.180786 査読有
- 他
- 〔学会発表〕(計 20 件)
1. 木村宏：クロマチン修飾ダイナミクスと転写制御. 第 40 回日本分子生物学会年会 (Combio2017). 神戸. 2017/12/6-9. Hiroshi Kimura: Chromatin Integration Labeling Technology. 平成 29 年度遺伝研研究会『エピジェネティクスの基盤となるクロマチン・細胞核の動的構造変換』. 三島. 2017/10/26-27.
 2. Hiroshi Kimura: Chromatin modification dynamics during cell differentiation. Gordon Research Conference “Genome Architecture in Cell Fate & Disease”, Hong Kong, China, 2017/7/2-7.
 3. Hiroshi Kimura: Chromatin modification dynamics during gene activation in living cells. 10th

- Berlin Summer Meeting, Max Delbruck Center, Berlin, Germany, 2017/6/8-10.
4. Hiroshi Kimura: Chromatin modification dynamics during gene activation in living cells. 4D Nucleome : The Cell Nucleus in Space and Time, Krakow, Poland, 2017/5/14-17.
 5. 木村 宏: クロマチン修飾動態解析によるヌクレオーム研究. よこはま NMR 研究会 第 56 回ワークショップ. 横浜. 2017/3/3
 6. Hiroshi Kimura: Live cell imaging of histone RNA polymerase II modifications. 第 39 回日本分子生物学会 シンポジウム. 横浜. 2016/11/30-12/02
 7. 木村 宏: 転写活性化におけるヒストン修飾の役割. 遺伝研研究会『クロマチン・細胞核の動的構造変換とエピジェネティクス制御』. 三島. 2016/10/27-28
 8. Hiroshi Kimura: Histone modification dynamics in living cell. Colorado Chromatin Meeting 2016, Fort Collins, Colorado, USA, 2016/8/8.
 9. Hiroshi Kimura: Tracking post-translational modifications in living cells. UK-Japan Symposium "From single molecules to cells and tissues", Leicester, UK, 2016/7/4-5
 10. Hiroshi Kimura: Tracking posttranslational and epigenetic modifications of endogenous proteins in vivo. 24th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus/57th Symposium of the Society for Histochemistry. Vienna, Austria. 2015/8/20
 11. 木村 宏: エピゲノム修飾の性細胞・生体内ダイナミクス. 第 9 回日本エピジェネティクス研究会. 東京. 2015/5/25

他

〔図書〕(計 1 件)

1. 原口徳子, 木村 宏, 平岡 泰. 新・生細胞 蛍光イメージング, 共立出版, 2015 年 11 月 25 日, 340 ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: ヒストン H3 トリメチル化リシン特異的モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片

発明者: 木村 宏, 佐藤優子, 大井彰人, 胡桃坂仁志, 鯨井智也, 大川恭行

権利者: 国立大学法人東京工業大学

種類: 特願

番号: 2017-111580 (PCT/JP2018/021688)

出願年月日: 2017 年 6 月 6 日 (2018 年 6 月 6 日)

国内外の別: 国内 (国際)

〔その他〕

ホームページ等

東京工業大学・木村宏研究室:

<http://kimura-lab.bio.titech.ac.jp/>

東京工業大学・木村宏研究者情報

http://t2r2.star.titech.ac.jp/cgi-bin/researcherinfo.cgi?q_researcher_content_number=CTT100673940

東京工業大学・科学技術創成研究院・細胞制御工学研究センター

<http://www.rcb.iir.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 宏 (KIMURA Hiroshi)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

研究者番号: 30241392

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし